

10/536822

PCT/JP 03/15132

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

27.11.03

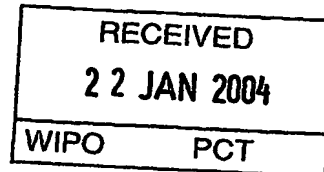
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日      2 0 0 3 年 1 1 月 1 0 日  
Date of Application:

出 願 番 号      特 願 2 0 0 3 - 3 7 9 7 9 6  
Application Number:  
[ST. 10/C]:      [J P 2 0 0 3 - 3 7 9 7 9 6]

出 願 人      アークレイ株式会社  
Applicant(s):



CERTIFIED COPY OF  
PRIORITY DOCUMENT

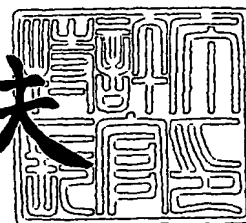
**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1 (a) OR (b)

REST AVAILABLE COPY

2 0 0 4 年   1 月   8 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願  
【整理番号】 C7A13083  
【提出日】 平成15年11月10日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 C07H 1/06  
【発明者】  
    【住所又は居所】 京都府京都市南区東九条西明田町 5 7 番地 アークレイ株式会社  
                                内  
    【氏名】 橋口 智史  
【発明者】  
    【住所又は居所】 京都府京都市南区東九条西明田町 5 7 番地 アークレイ株式会社  
                                内  
    【氏名】 猪瀬 健  
【特許出願人】  
    【識別番号】 000141897  
    【住所又は居所】 京都府京都市南区東九条西明田町 5 7 番地  
    【氏名又は名称】 アークレイ株式会社  
    【代表者】 土井 茂  
【代理人】  
    【識別番号】 100080621  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 矢野 寿一郎  
    【電話番号】 06-6944-0651  
【手数料の表示】  
    【予納台帳番号】 001890  
    【納付金額】 21,000円  
【提出物件の目録】  
    【物件名】 特許請求の範囲 1  
    【物件名】 明細書 1  
    【物件名】 図面 1  
    【物件名】 要約書 1

**【書類名】 特許請求の範囲****【請求項 1】**

電気泳動を用いた核酸の濃縮精製方法であって、  
核酸を含む試料中の夾雑物に対して、  
荷電量の調節を行った後に、試料を電界中におき、  
核酸の濃縮精製を行うことを特徴とする核酸の濃縮精製方法。

**【請求項 2】**

電気泳動による核酸の濃縮精製方法であって、  
核酸を含む試料に陽イオン界面活性剤を加えて、  
試料中夾雑物への荷電量を調節し、該試料を電界中におき、  
電気泳動することにより、  
核酸の濃縮精製を行うことを特徴とする核酸の濃縮精製方法。

**【請求項 3】**

電気泳動による核酸の濃縮精製方法であって、  
核酸を含む試料中に陽イオン界面活性剤および非イオン界面活性剤を加えて、  
試料中夾雑物への荷電量を調節し、該試料を電界中におき、  
電気泳動することにより、  
核酸の濃縮精製を行うことを特徴とする核酸の濃縮精製方法。

**【請求項 4】**

核酸以外への荷電量調節を、陽イオン界面活性剤の吸着により行うとともに、陽イオン界面活性剤の吸着量を非イオン界面活性剤の添加量により調節することを特徴とする請求項 3 に記載の核酸の濃縮精製方法。

**【請求項 5】**

試料に非イオン界面活性剤および陽イオン界面活性剤を添加し、  
該試料を電気泳動し、  
陽極側において核酸の濃縮精製を行うことを特徴とする核酸の濃縮精製装置。

**【請求項 6】**

電気泳動を行う核酸の濃縮精製装置であって、  
側面を絶縁体により構成した容器内を、  
拡散を抑制する導電性の分離体により仕切り、  
該容器内に試料投入室および核酸回収室を構成し、  
該容器の端部がそれぞれバッファ槽を介して、  
電極に接続していることを特徴とする核酸の濃縮精製装置。

【書類名】明細書

【発明の名称】核酸の濃縮精製方法および装置

【技術分野】

【0001】

本発明は、検体の前処理を行うデバイスに関するものである。より詳しくは、核酸検査において、菌体などより検査対象となる核酸を取出すための前処理デバイスに関するものである。

【背景技術】

【0002】

近年、ヒトゲノムの解読が進み、さまざまな生命現象と遺伝子の関連が解明されてきている。そして、この成果により、医学・医療は病態から病因へ、治療から予防へと視野を広げている。ここにおいて、遺伝子検査技術は重要な基盤となっている。

遺伝子検査は、培養困難な病原微生物の同定検査、抗生物質加療中や感染初期の病原微生物の検出、移行抗体が疑われた際の抗原検出、病原微生物の感染源調査、親子鑑定などの個人識別、さらに白血病・固形腫瘍の遺伝子レベルの病型診断や遺伝病の確定診断などの従来の臨床検査では困難であった検査を行うことができる。そして、結果を得るまでの時間が、菌の培養を用いる手法に比べて短く、培養に時間のかかる細菌の検出には威力を発揮する。さらにDNAは保存条件によっては安定しているため、凍結生検材料、骨など過去の検体からも検査を行うことができる。

また、近年増加傾向にある性感染症の検査において、検査機会の拡大を図るべく、遺伝子検査が注目されている。

【0003】

従来核酸の精製濃縮方法としては、フェノール／クロロホルム／エタノールを用いた精製方法、核酸を吸着するカラム／フィルターを用いた精製方法、磁性シリカビーズを用いた精製方法等が知られている。

【0004】

さらに、平板状の電気泳動ゲルから核酸を回収する方法として、作成したゲルにおいて核酸を電気泳動し、ゲルにおいて目的とする核酸の位置に回収装置を移動し、更なる電気泳動により目的とする核酸を回収する方法が知られている（例えば、特許文献1参照）。

この他に、平板状の電気泳動ゲルにおいて、核酸を電気泳動して目的とする核酸を分離し、目的とする核酸のバンド近傍に回収チップを挿入して核酸を回収する方法が知られている（例えば、特許文献2参照）。

【0005】

【特許文献1】実開平5-88296号公報

【特許文献2】特開平8-327595号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

しかし、従来核酸の精製濃縮方法において、フェノール／クロロホルム／エタノールを用いた精製方法は、劇薬を使用するため、高度の化学設備を必要とするものであり、利用する環境が限定される。そして、操作に手間がかかるとともに、高速遠心が必要となり、自動化が困難である。また、高い精製精度を得ることが困難である。

核酸を吸着するカラム／フィルターを用いた精製方法は、溶液を流しながら行うため、ごみ等の混入量の多いサンプルでは、カラム／フィルターが目詰まりを起こしやすく、精製効率が低くなる可能性がある。そして、遠心もしくは吸引操作を行う必要があるため、自動化が困難である。

さらに、磁性シリカビーズを用いた精製方法は、磁石によるビーズの回収を失敗した場合や、シリカビーズが磁性体より剥落した場合には、サンプルにシリカが混入する可能性がある。そして、高い回収率を得ることが困難である。

【0007】

さらに、平板状の電気泳動ゲルから核酸を回収する従来の技術においては、平板状の電気泳動ゲルを必要とするとともに、この平板状の電気泳動ゲルにおいて一端電気泳動を行い、目的核酸の該当位置のゲルを処理する必要がある。

電気泳動に用いられるゲルは、衝撃に弱く、生成過程により、特性が大きくことなる場合がある。このため、一般に電気泳動を行った後に、紫外線により電気泳動ゲルにおける目的核酸の位置を認識した後に、目的核酸の含有量の多い部分を処理するものである。

#### 【0008】

このため、遺伝子検査等にこの手法を利用する場合には、一回の検査にかかる時間が長くなる。また、電気泳動に用いるゲルが大きくゲルのムラによる核酸のバンドににじみにより核酸の回収率が低下する可能性がある。さらに、ゲルが大きい場合には、電気泳動に必要となる電力が大きくなる。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0009】

上記の課題を解決すべく、様々の試験が行われ、検体中に存在する夾雑物に界面活性剤を吸着させ、核酸と異なる挙動を示させることにより、夾雑物と核酸とを分離させることが見出されたものである。

そして、陽イオン界面活性剤と非イオン界面活性剤で核酸以外の夾雑物を帯電させ、電界中におくことで、夾雑物を含む検体より核酸を分離精製し、核酸の濃縮もしくは濃縮しやすい状態とするものである。

#### 【0010】

図1は界面活性剤存在下における電気泳動による核酸濃縮構成を示す模式図である。

検体中には、核酸1とともに夾雑物2が含まれるものである。この検体中に、界面活性剤を混合する。界面活性剤としては非イオン界面活性剤3と陽イオン界面活性剤4とを用いるものである。

検体中に混合された界面活性剤は夾雑物2に吸着する。陽イオン界面活性剤4が吸着した夾雑物2は、正電荷に帯電することとなる。そして、界面活性剤の吸着した夾雑物2と、界面活性剤の吸着していない、もしくは吸着量の少ない核酸1とを電気泳動により分離することができるものである。これにより、検体から夾雑物2を容易に取り除くことができ、核酸1を濃縮できるものである。

#### 【0011】

次に、核酸濃縮の手法について説明する。

この核酸濃縮の手法において、電気泳動を2回行うことにより、核酸の濃縮を確実に行うものである。第一に電気泳動においては検体中の余分なイオンを除き、第二の電気泳動においては検体中の核酸の濃縮を行うものである。

#### 【0012】

まず、核酸を含む検体に非イオン界面活性剤として、1% Triton (登録商標) X-100を加えて混合する。

非イオン界面活性剤を加えた検体を、96℃で10分間加熱する。

そして、検体に陽イオン界面活性剤として、0.2% DCPを100μL加える。

なお、検体には、非イオン界面活性剤と陽イオン界面活性剤を同時に加えた後に、加熱処理を行うことも可能である。

検体に界面活性剤を加えて前処理を行うため、核酸が大腸菌などの原核細胞内に存在する場合においても、細胞壁が界面活性剤により破壊されることから、大腸菌の培養液などを検体として用いることができ、検体前処理の操作を容易に行うことができるものである。

このように検体の前処理を行い、100Vの直流電圧を加え10分間電気泳動を行い、検体中の余分なイオンを除去する。

この後に、125~150Vの直流電圧を加え、120分間電気泳動を行い、正極側において核酸を採取するものである。

#### 【0013】

検体の電気泳動を行う電気泳動槽の構成について説明する。

まず、第一の電気泳動について説明する。

図2は第一電気泳動の泳動槽構成を示す図である。

電気泳動槽5内にはサンプル槽6、正極側と負極側とを分ける隔壁9が設けられている。サンプル槽6は隔壁9に貫通しており、一端が正極側に、他端が負極側に突出した構成となっている。サンプル槽6の両端は開口しており、両端の開口部はそれぞれゲル8・8により閉じられている。これにより、サンプル槽6内に電位差を発生させて核酸および界面活性剤が吸着した夾雑物の電気泳動を行うものである。

#### 【0014】

検体に非イオン界面活性剤と陽イオン界面活性剤を加え、加熱処理を行った後に、検体をサンプル槽6に注入する。

そして、電極間に100Vの電圧を加えて、10分間の電気泳動を行うものである。

これにより、検体中に含まれる余分なイオンを除くものである。

検体中に含まれる余分なイオンを除いた後に、第二に電気泳動により核酸の濃縮を行うものである。

#### 【0015】

第二電気泳動について説明する。

第二の電気泳動においては、第一の電気泳動で検体を注入したサンプル槽に、核酸の回収槽を接続していたものを電気泳動槽内に配置して電気泳動を行うものである。

図3は第二電気泳動の泳動槽構成を示す図である。

電気泳動槽5内にはサンプル槽6、回収槽7、正極側と負極側とを分ける隔壁9が設けられている。サンプル槽6は隔壁9に挿入され、負極側に突出した構成となっている。回収槽7は隔壁9に挿入され、正極側に突出した構成となっている。サンプル槽6と回収槽7とは隔壁9配設部において接続されており、ゲル8を介して接続されている。

サンプル槽6の両端は開口しており、両端の開口部はそれぞれゲル8・8により閉ざされている。そして、回収槽7の両端は開口しており、負極側はゲル8により閉じられており、正極側は限外ろ過膜11により閉じられている。

このように構成された電気泳動槽において、電極間に120Vの電圧を加え、120分間の電気泳動を行うものである。

#### 【0016】

このように、電気泳動槽において第二の電気泳動を行うことにより、余分なイオンを除いた検体を電気泳動することができ、回収槽7において核酸を効率的に回収できるものである。また、回収槽7の正極側には限外ろ過膜11を設けており、核酸は回収槽7より排出されることなく、回収槽7内にとどまる。このため、核酸の回収効率を向上することができるものである。

なお、検体の状態によっては、第一の電気泳動を行うことなく、第二の電気泳動を行うことも可能である。回収槽7に接続したサンプル槽6に前処理を行った検体を注入して電気泳動することにより、容易に核酸の濃縮を行うことができるものである。検体中に存在する余分なイオンは限外ろ過膜を透過できるので、核酸の回収に影響をあたえない。

#### 【0017】

すなわち、本発明は請求項1に記載のごとく、電気泳動を用いた核酸の濃縮精製方法であって、核酸を含む試料中の夾雑物に対して、荷電量の調節を行った後に、試料を電界中におき、核酸の濃縮精製を行う。

#### 【0018】

請求項2に記載のごとく、電気泳動による核酸の濃縮精製方法であって、核酸を含む試料に陽イオン界面活性剤を加えて、試料中夾雑物への荷電量を調節し、該試料を電界中におき、電気泳動することにより、核酸の濃縮精製を行う。

#### 【0019】

請求項3に記載のごとく、電気泳動による核酸の濃縮精製方法であって、核酸を含む試料中に陽イオン界面活性剤および非イオン界面活性剤を加えて、試料中夾雑物への荷電量

を調節し、該試料を電界中におき、電気泳動することにより、核酸の濃縮精製を行う。

#### 【0020】

請求項4に記載のごとく、核酸以外への荷電量調節を、陽イオン界面活性剤の吸着により行うとともに、陽イオン界面活性剤の吸着量を非イオン界面活性剤の添加量により調節する。

#### 【0021】

請求項5に記載のごとく、試料に非イオン界面活性剤および陽イオン界面活性剤を添加し、該試料を電気泳動し、陽極側において核酸の濃縮精製を行う装置を構成する。

#### 【0022】

請求項6に記載のごとく、電気泳動を行う核酸の濃縮精製装置であって、側面を絶縁体により構成した容器内を、拡散を抑制する導電性の分離体により仕切り、該容器内に試料投入室および核酸回収室を構成し、該容器の端部がそれぞれバッファ槽を介して、電極に接続している装置を構成する。

#### 【発明の効果】

#### 【0023】

本発明は、請求項1に記載のごとく、電気泳動を用いた核酸の濃縮精製方法であって、核酸を含む試料中の夾雑物に対して、荷電量の調節を行った後に、試料を電界中におき、核酸の濃縮精製を行う方法をとるので、

電気泳動における核酸と夾雑物の挙動に相違をあたえ、核酸を効率的に分離できる。夾雑物と核酸との挙動における差異を荷電により調節可能であり、挙動の制御を容易に行える。

遠心分離装置などを利用する必要がなく、核酸濃縮を行う機構をコンパクトに構成することができる。

#### 【0024】

請求項2に記載のごとく、電気泳動による核酸の濃縮精製方法であって、核酸を含む試料に陽イオン界面活性剤を加えて、試料中夾雑物への荷電量を調節し、該試料を電界中におき、電気泳動することにより、核酸の濃縮精製を行う方法をとるので、

陽イオン界面活性剤を用いるので、操作容易であり、作業の安全を容易に確保できる。そして、夾雑物への吸着量を増大させることにより、電気泳動における核酸と夾雑物との挙動差を大きくすることができ、核酸を効率的に分離できる。さらに、夾雑物が核酸とは反対方向に泳動されるので、夾雑物による精製の阻害を防止でき、核酸の精製を容易に行うことができる。

#### 【0025】

請求項3に記載のごとく、電気泳動による核酸の濃縮精製方法であって、核酸を含む試料中に陽イオン界面活性剤および非イオン界面活性剤を加えて、試料中夾雑物への荷電量を調節し、該試料を電界中におき、電気泳動することにより、核酸の濃縮精製を行うので、

陽イオン界面活性剤と非イオン界面活性剤との割合により陽イオン界面活性剤の吸着量を調節可能であり、電気泳動における夾雑物の挙動を容易に調節できるものである。

また、核酸に非イオン界面活性剤を吸着させることにより、核酸への陽イオン界面活性剤の吸着を阻害することも可能である。

#### 【0026】

請求項4に記載のごとく、核酸以外への荷電量調節を、陽イオン界面活性剤の吸着により行うとともに、陽イオン界面活性剤の吸着量を非イオン界面活性剤の添加量により調節するので、

容易な操作により、夾雑物への陽イオン界面活性剤と非イオン界面活性剤の吸着割合を操作することができる。さらに、夾雑物帯電量の調節を容易な操作により行うことができる。また、核酸に非イオン界面活性剤を吸着させることにより、核酸への陽イオン界面活性剤の吸着を阻害することも可能である。

#### 【0027】

請求項5に記載のごとく、試料に非イオン界面活性剤および陽イオン界面活性剤を添加し、該試料を電気泳動し、陽極側において核酸の濃縮精製を行う装置を構成するので、簡便な構成により、試料中の核酸を精製することができるとともに、核酸の挙動を制御可能であるため、安全性を維持しながら、濃縮精製装置をコンパクトに構成できる。

#### 【0028】

請求項6に記載のごとく、電気泳動を行う核酸の濃縮精製装置であって、側面を絶縁体により構成した容器内を、拡散を抑制する導電性の分離体により仕切り、該容器内に試料投入室および核酸回収室を構成し、該容器の端部がそれぞれバッファ槽を介して、電極に接続している装置を構成するので、

簡便な構成により、濃縮精製装置を構成可能であり、製作にかかるコストを低減するとともに、制御が容易かつ安全性の高い装置を構成することが可能である。

【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0029】

危険な薬品を使うことなく、精製率の高い核酸濃縮装置を構成するという目的を、界面活性剤と電気泳動を用いた手法により実現した。

#### 【実施例1】

#### 【0030】

次に、本発明の実施例について説明する。

まず、電気泳動に用いる電気泳動槽の構成について説明する。

図4は第一電気泳動槽の構成を示す図である。

電気泳動槽21は隔壁24・25により、負極側槽22と正極側槽23とに分けられている。隔壁24・25は電気泳動槽21の中央部に配設されており、隔壁24・25にサンプルユニット26が装着されている。サンプルユニット26は一端を負極側槽22に、他端を正極側槽23に突出した構成となっている。サンプルユニット26の負極側にはゲルが詰められており、側面にサンプル注入用の注入孔が開けられている。注入孔は電気泳動時には栓により閉じられるものである。

そして、負極側槽22に負極が挿入され、正極側槽23に正極が挿入され、電気泳動槽21に電圧がかけられるものである。

#### 【0031】

次に、電気泳動槽の他の構成例について説明する。

図5は第二電気泳動槽の構成を示す図である。

第二電気泳動において、電気泳動槽21は隔壁24・25により、負極側槽22と正極側槽23とに分けられている。隔壁24・25は電気泳動槽21の中央部に配設されており、隔壁24・25に分離ユニット32が装着されている。分離ユニット32は一端を負極側槽22に、他端を正極側槽23に突出した構成となっている。そして、負極側槽22に負極が挿入され、正極側槽23に正極が挿入され、電気泳動槽21に電圧がかけられるものである。

分離ユニット32は、3つの部材を接続して構成するものであり、サンプリングユニット26、接続部33、ろ過部34とにより構成される。サンプリングユニット26と接続部33との間、および接続部33とろ過部34との間にはOリングが装着され接続を確保するとともに、緩衝液の流出を防止しているものである。

なお、サンプリングユニット26の負極側にはゲルが詰められており、接続部33の正極側にもゲルが詰められている。そして、ろ過部34には限界ろ過膜が装着されている。

#### 【0032】

このような電気泳動槽を用いて、核酸の濃縮を行うものである。

まず、第一電気泳動において、溶解したサンプルを注入孔より入れ栓をする。そして、電気泳動槽21にサンプルユニット26を上面が少し液から出るように設置する。この後、100Vの直流電圧をかけ、20分間電気泳動を行うものである。これによりサンプル中の余分なイオンを取り除くものである。なお、緩衝液は1×TAE溶液、40mM Tris、40mM 氷酢酸、1mM EDTAにより調製し、pH8.0とした。



## 【0033】

そして、第一電気泳動槽 21 において余分なイオンを取り除いた後に、サンプルユニット 26 に接続部 33 およびろ過部 34 を接続するものである。各接続箇所には Oリングを装着し、液漏れを防ぐものである。

接続部 33 内には、100%エタノールと 1xTAE を 6:4 で混合した液を入れ、サンプリングユニット 26 内には  $\text{TE}^{-1}$  (10mM Tris-HCl、0.1mM EDTA、pH 8.0) を入れておくものである。

## 【0034】

次に、サンプリングユニット 26、接続部 33、ろ過部 34 の構成について説明する。

まず、サンプリングユニット 26 の構成について説明する。

図 6 はサンプリングユニットの構成を示す斜視図であり、図 7 はサンプリングユニットの平面図であり、図 8 はサンプリングユニットの側面図であり、図 9 はサンプリングユニットの側面断面図である。

サンプリングユニット 26 は、容器にゲルを保持させて構成するものであり、ミリポア社製のマイクロコン (登録商標) YM-3 マイクロコン 遠心式フィルタユニットを加工して利用するものであり、内部の限界ろ過膜をはずし、内部に直径 5 mm の孔を開けたものである。なお、同様の効果を得られるものであれば、これに限らず用いることが出来るものである。

サンプリングユニット 26 は筒体 41 と台座 43 とにより構成されている。筒体 41 は台座 43 に接続しており、サンプルを注入するための注入孔 42 が設けられている。台座 43 は段付き円柱状に構成されており、台座 43 には上下面に連通する孔 44 が構成されている。

筒体 41 内にはゲル 48 が配設されている。ゲル 48 の厚みは数 mm 程度であり、筒体 41 の開口部をふさぐ構成となっている。これにより、注入孔 42 より供給された検体がゲル 48 の内側に供給されるものである。

## 【0035】

接続部 33 の構成について説明する。

図 10 は接続部の斜視図であり、図 11 は接続部の側面断面図である。

接続部 33 もサンプリングユニット 26 と同様に、ミリポア社製の遠心式フィルタユニットを加工して利用するものであり、内部の限界ろ過膜をはずし、内部に直径 5 mm の孔を開けたものである。

接続部 33 は筒体 41 と台座 43 とにより構成されている。筒体 41 は台座 43 に接続している。台座 43 は段付き円柱状に構成されており、台座 43 には上下面に連通する孔 44 が構成されている。

筒体 41 内には、厚み数 mm 程度ゲル 48 を配設している。ゲル 48 は、筒体 41 内において、台座 43 の上面に位置しており、サンプリングユニット 26 との間の液体の流動を防止するものである。

## 【0036】

ろ過部 35 について説明する。

図 12 はろ過部の側面断面図である。

ろ過部 35 もミリポア社製の遠心式フィルタユニットを加工して利用するものである。

ろ過部 35 は筒体 41 と台座 43 とにより構成されている。筒体 41 は台座 43 に接続しており、筒体 41 の長さはサンプリングユニット 26 や接続部 33 よりも短く構成されており、約 5 mm 短く構成されているものである。台座 43 は段付き円柱状に構成されており、台座 43 には上下面に連通する孔 44 が構成されている。

そして、筒体 41 内において、台座 43 の上面に限界ろ過膜 49 が配設されている。これにより核酸の流出を防ぎ、核酸の濃縮を行うことが可能となる。

## 【0037】

次に、核酸の濃縮操作例について説明する。

検体として、大腸菌培養液を用いて、上記の第一電気泳動および第二電気泳動により核

酸の濃縮を行い、回収された核酸濃度を吸光度測定により調べた。

検体は、大腸菌 (*Escherichia coli* DH5 $\alpha$ ) 培養液 100  $\mu$ L を用いた。

検体に、1% Triton (登録商標) X-100 溶液 100  $\mu$ L を加え、96℃で 10 分間加熱処理した。

この後に 0.2% DPC を 100  $\mu$ L 加え、電気泳動用の試料を調製した。

#### 【0038】

電気泳動用のバッファとしては 0.5x TAE を使用した。

アガロースの溶解には 1x TAE を使用した。

なお、1x TAE 溶液は、40mM Tris、40mM 氷酢酸、1mM EDTA により調製し、ペーハーは pH 8.0 であった。

接続部 33 を筒体 41 の開口側を上方にしてに静置し、筒体 41 の開口側より、1% アガロースゲル (SeaKem Gold agarose: TaKaRa から購入) をゲルの厚さが数 mm 程度になるように流し込み、ゲルを固めた。

サンプリングユニット 26 も接続部 33 と同様に、を筒体 41 の開口側を上方にしてに静置し、筒体 41 の開口側より、1% アガロースゲル (SeaKem Gold agarose: TaKaRa から購入) をゲルの厚さが数 mm 程度になるように流んだ。そして、ゲルが固まった後に、サンプリングユニット 26 をひっくり返し、筒体 41 の開口側に固まったゲルを流し込んだ。

#### 【0039】

電気泳動槽は HU-6 (エアブラウン社製) を用い、電源は MPSU-200 (エアブラウン社製) を用いた。

サンプリングユニット 26 の注入孔 42 より、調製した電気泳動用試料を入れて栓をした。

電気泳動槽をパテにより正極側と負極側とに分離し正極側と負極側に 0.5x TAE を入れた。

そして、パテにサンプリングユニット 26 の上面が少しバッファ液から出るように設置した。

この後に、直流電圧 100 V をかけ、20 分間第一の電気泳動を行った。

#### 【0040】

次に、第一の電気泳動を行った後のサンプリングユニット 26 に接続部 33 と、ろ過部 34 とを接続して、分離ユニットを構成し、第二の電気泳動を行うものである。

第二電気泳動の操作例を説明する。

100% エタノールと 1x TAE とを 6 対 4 で混合した溶液を接続部 33 内に入れた。  
TE<sup>-1</sup> (10mM Tris-HCl、0.1mM EDTA、pH 8.0) 溶液をサンプリングユニット 26 内に入れた。

次に、サンプリングユニット 26 に接続部 33 と、ろ過部 34 とを接続して、分離ユニットを組み立てた。

#### 【0041】

図 13 は分離ユニットの組立て構成を示す図である。

分離ユニットは、サンプリングユニット 26、接続部 33、ろ過部 34 を同一方向に向けて組み立てるものであり、接続部 33 とろ過部 34 との間、および接続部 33 とろ過部 34 との間に Oリング 51 をそれぞれ装着して、分離ユニットよりの液漏れを防ぐものである。

#### 【0042】

電気泳動槽をパテにより正極側と負極側とに分離し正極側と負極側に 0.5x TAE を入れた。

組み立てた分離ユニットのサンプリングユニット 26 側端を負極側に、ろ過部 34 を正極側にしてパテに配置した。

この後に、直流電圧 200 V をかけ、240 分間、第二の電気泳動を行った。

## 【0043】

次に、ろ過部34において核酸溶液を回収して、吸光度の測定を行い、UVスペクトルより回収された核酸濃度を算出した。

図14は回収された液のUVスペクトルである。

算出された核酸濃度は、32.3 ng ( $6.7 \times 10^6$  コピー/ $\mu$ L)であった。

核酸濃度の算出は、260 nmにおける吸光度(A260)に、核酸の性状固有の係数をかけ、さらに、セルの光路長(mm)をかけて、10で割ったものである。

## 【0044】

また、回収された核酸の純度を、UVスペクトルより算出した。

算出された核酸の純度は、1.91であった。

純度の算出は、260 nmにおける吸光度(A260)を、280 nmにおける吸光度(A280)で割ることにより、行うものである。サンプルが純度100%のDNAの場合、この値は約1.8となる。また、純度100%のRNAの場合には2.0となる。A280の値は、被測定物に混入しているタンパク質やフェノールの量を反映し、吸光度比が1.5を大きく下回るような場合は、タンパク質などの低分子物質の混入が考えられるものである。

## 【産業上の利用可能性】

## 【0045】

本発明は、操作が簡便であるとともに、装置構成が簡易であるので、自動で核酸の濃縮および検査をおこなう検査装置などの用途にも適用できる。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0046】

【図1】界面活性剤存在下における電気泳動による核酸濃縮構成を示す模式図。

【図2】第一電気泳動の泳動槽構成を示す図。

【図3】第二電気泳動の泳動槽構成を示す図。

【図4】第一電気泳動槽の構成を示す図。

【図5】第二電気泳動槽の構成を示す図。

【図6】サンプリングユニットの構成を示す斜視図。

【図7】サンプリングユニットの平面図。

【図8】サンプリングユニットの側面図。

【図9】サンプリングユニットの側面断面図。

【図10】接続部の斜視図。

【図11】接続部の側面断面図。

【図12】ろ過部の側面断面図。

【図13】分離ユニットの組立て構成を示す図。

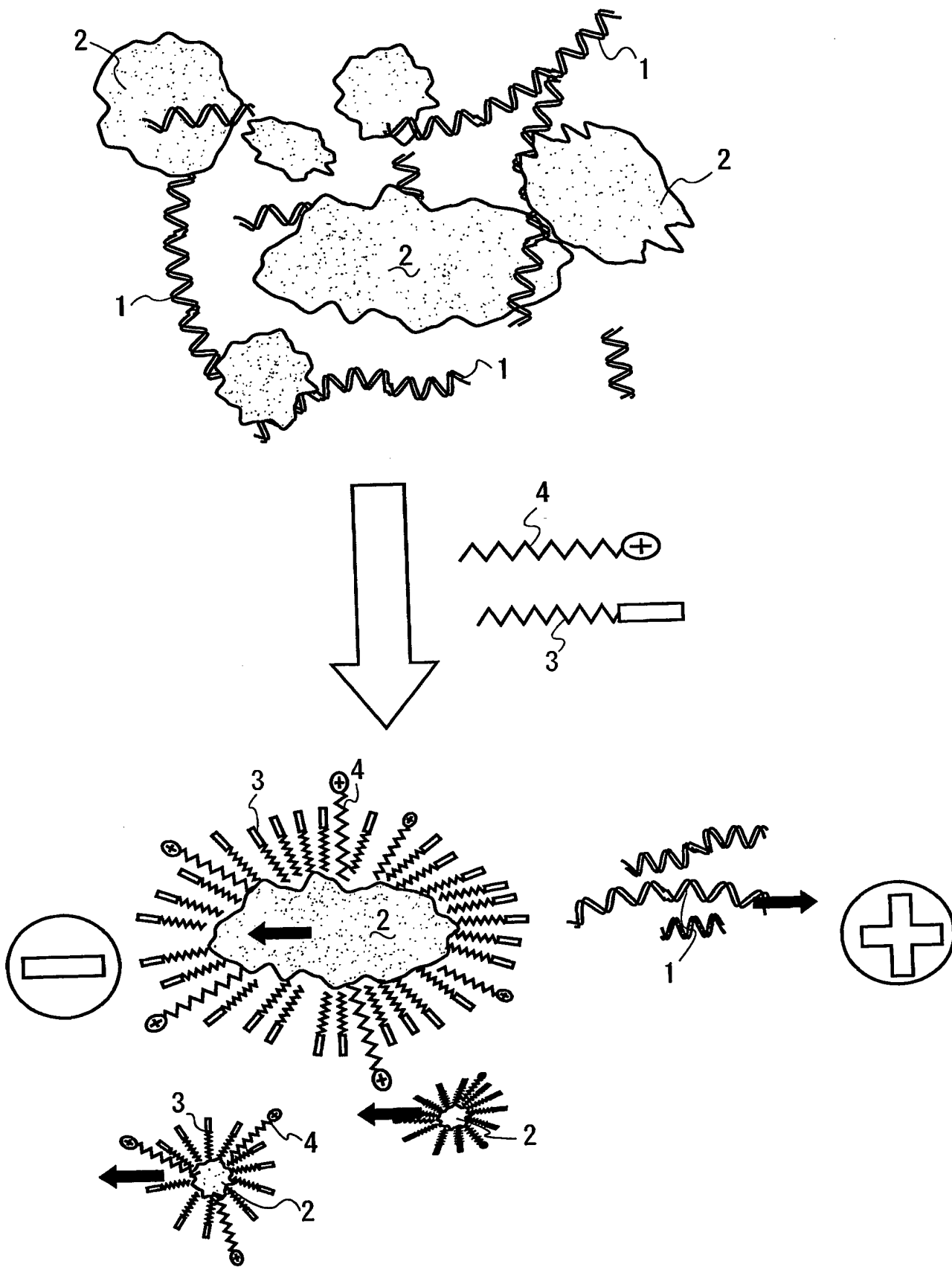
【図14】回収された液のUVスペクトル。

## 【符号の説明】

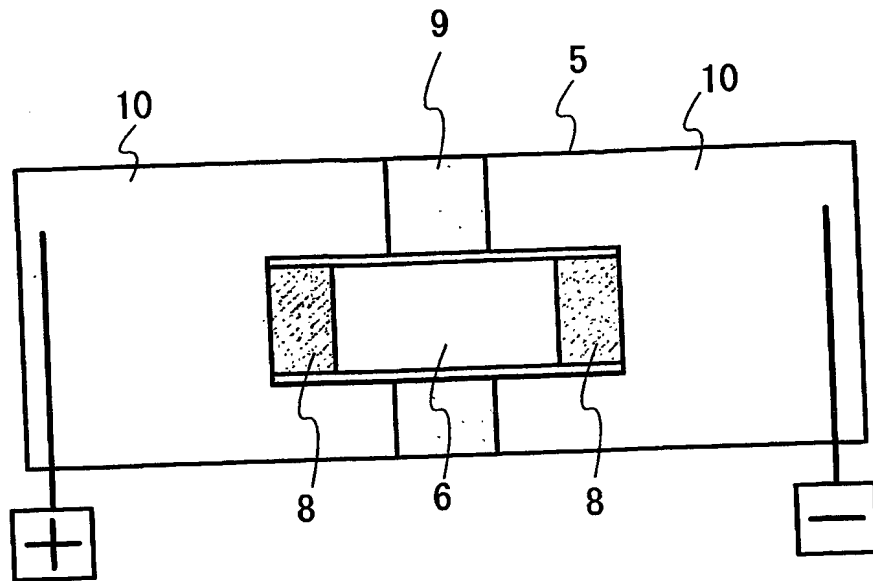
## 【0047】

- 1 核酸
- 2 夾雑物
- 3 非イオン界面活性剤
- 4 陽イオン界面活性剤
- 5 電気泳動槽
- 6 サンプル槽
- 9 隔壁

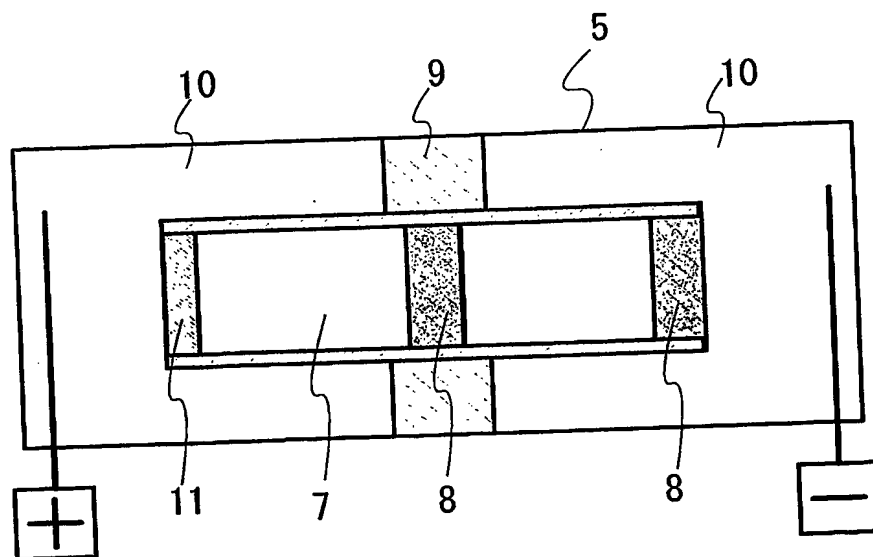
【書類名】 図面  
【図 1】



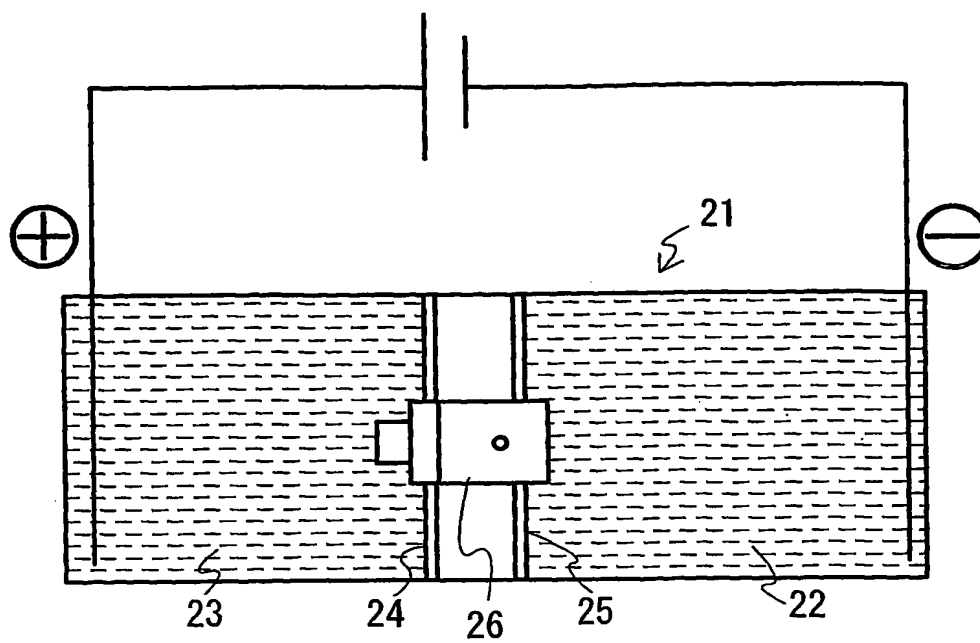
【図 2】



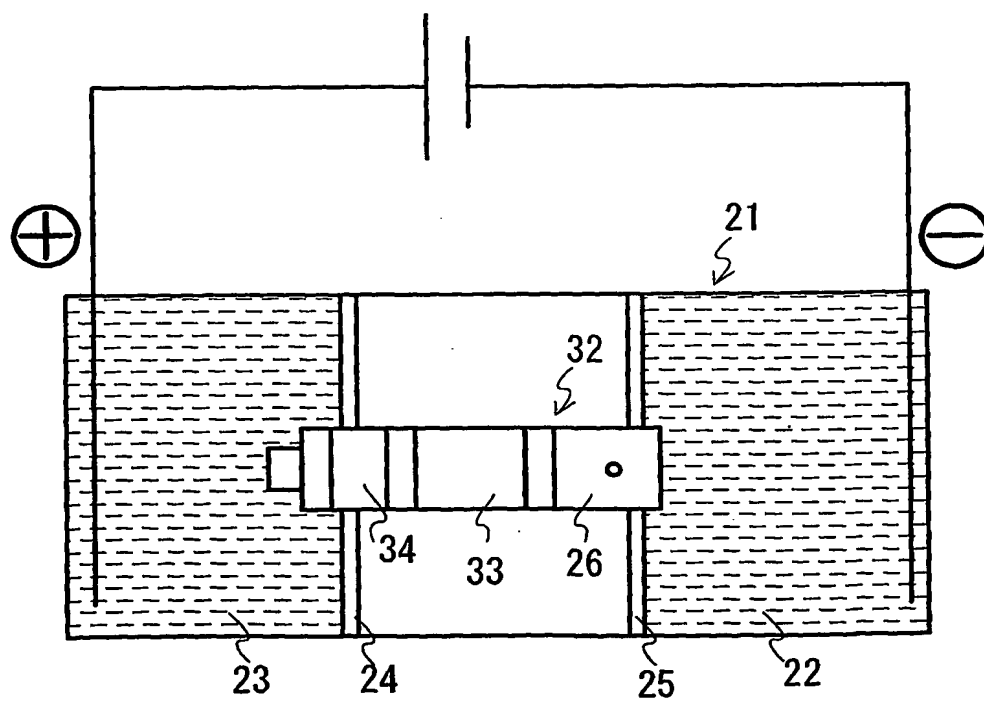
【図 3】



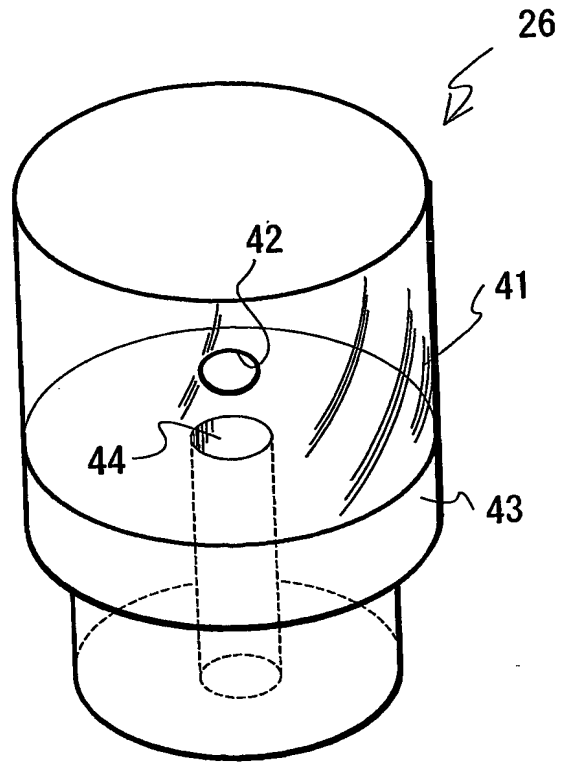
【図 4】



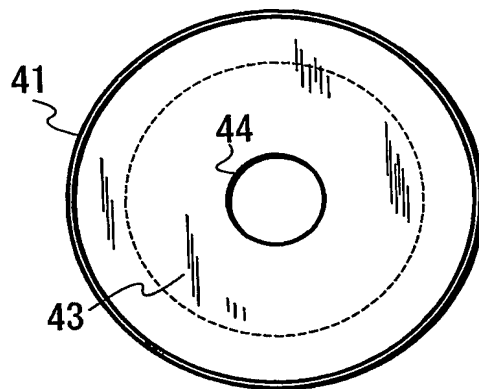
【図 5】



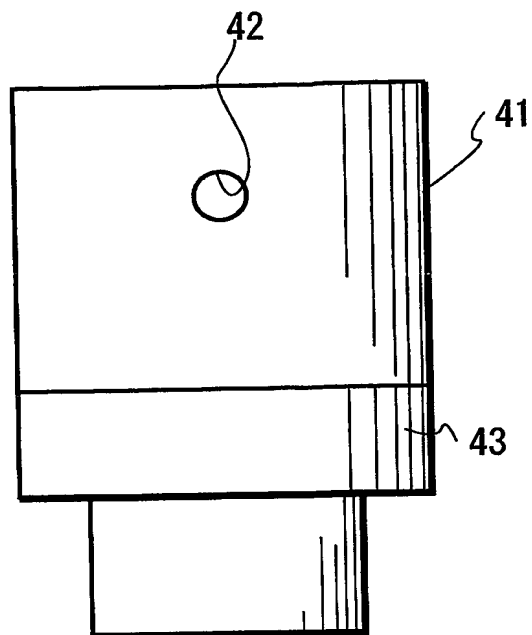
【図 6】



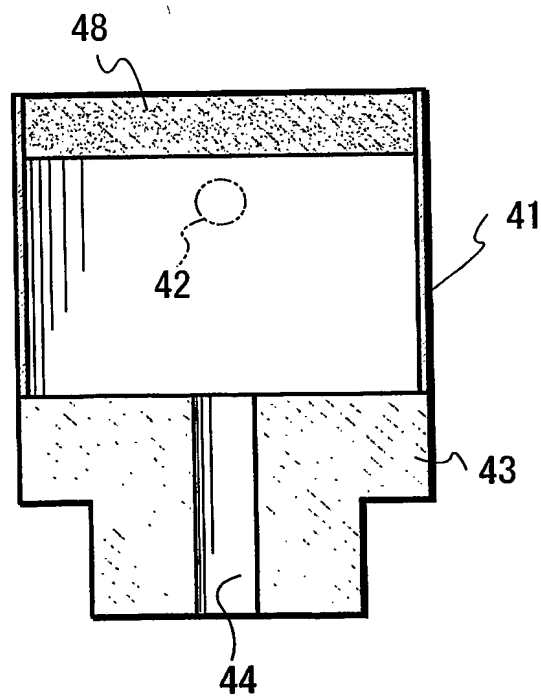
【図 7】



【図 8】

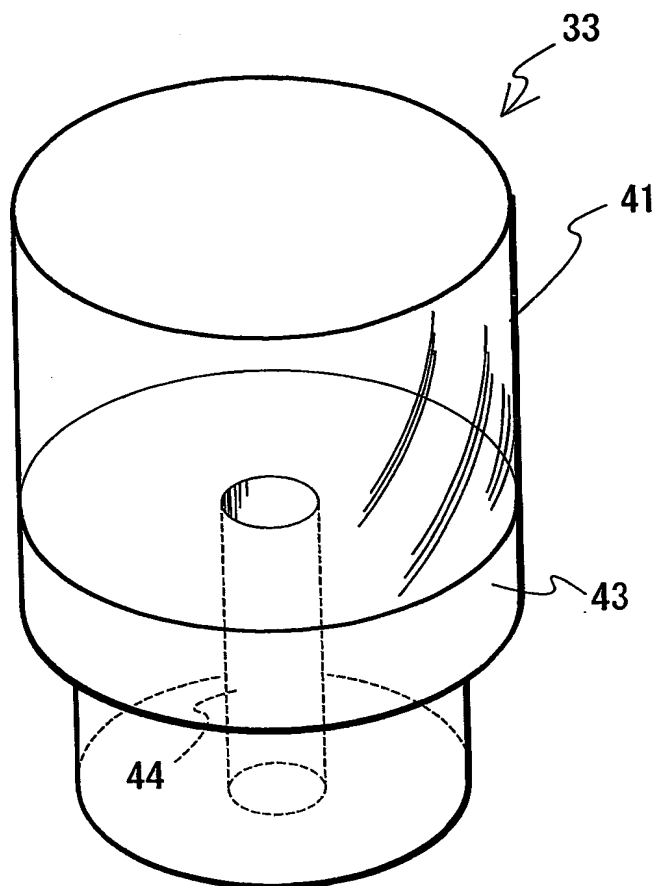


【図 9】

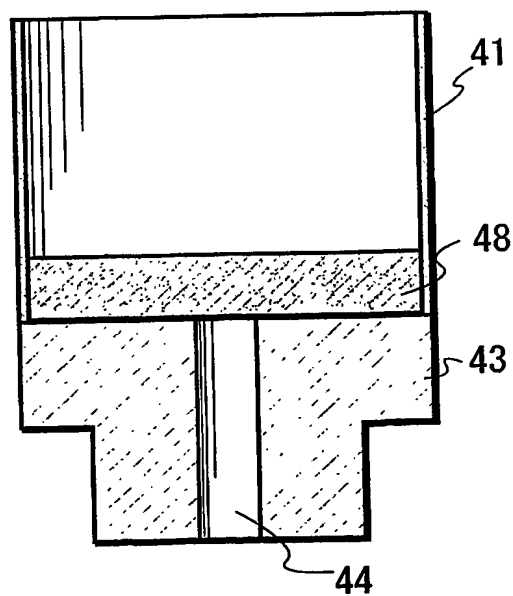




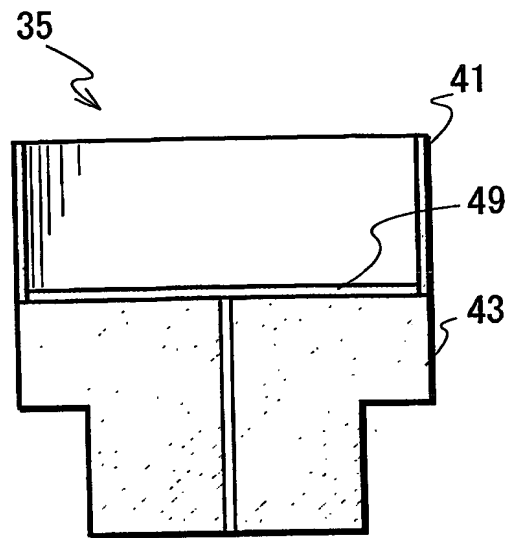
【図 10】



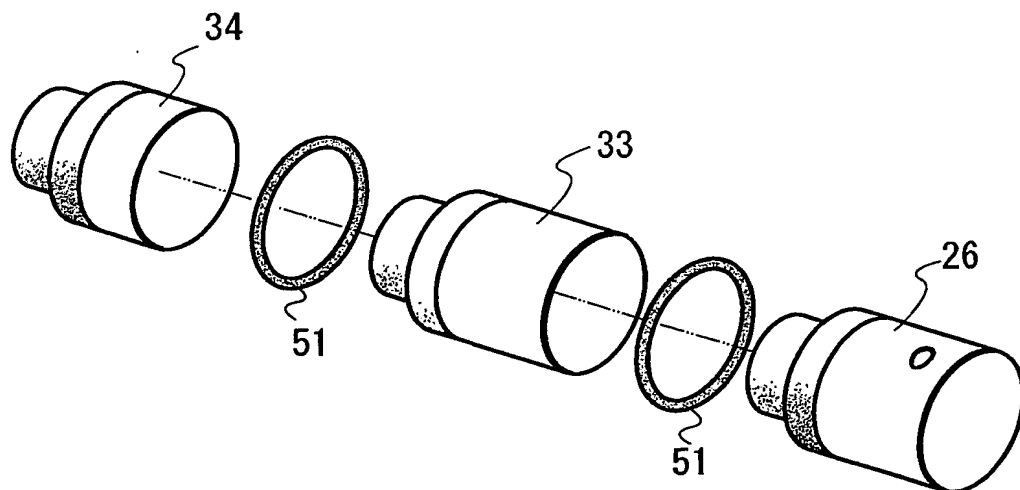
【図 11】



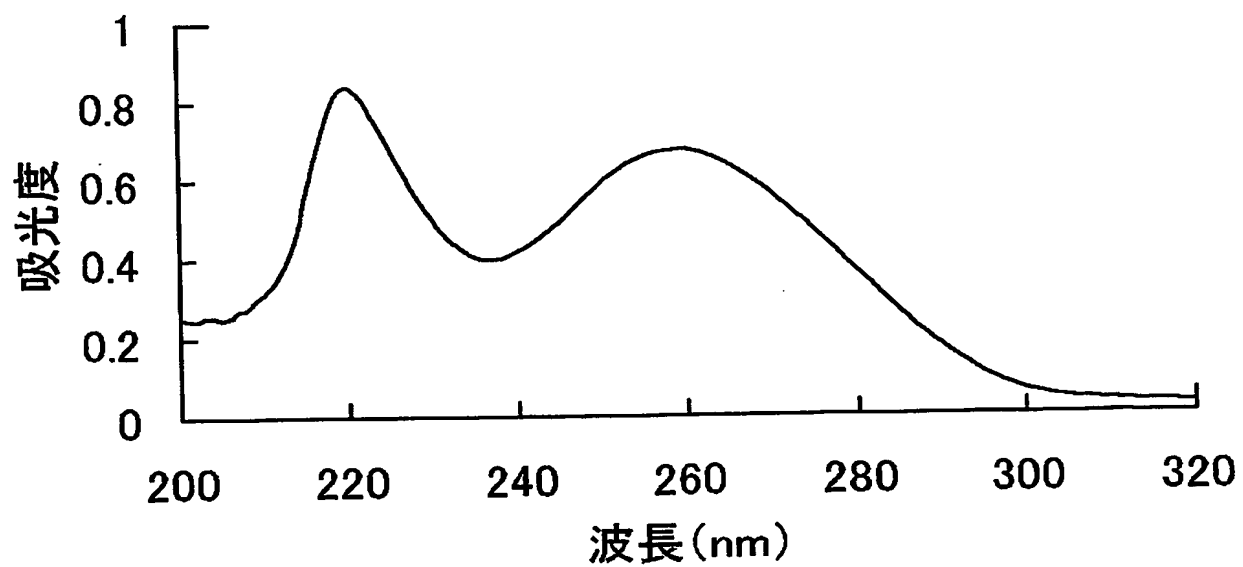
【図 12】



【図 13】



【図14】



## 【書類名】要約書

## 【要約】

【課題】 従来核酸の精製濃縮方法は、劇薬を使用するため、高度の化学設備を必要し、利用する環境が限定される。そして、操作に手間がかかり高速遠心等が必要で自動化が困難であり、高い精製精度を得ることも困難である。さらに、カラム／フィルターを用いた精製方法は、ごみの混入が多いサンプルでは目詰まりを起こし精製効率が低くなる可能性があり、遠心もしくは吸引操作を行う必要があり自動化が困難である。

【解決手段】 試料中に存在する夾雑物 2 に界面活性剤 3・4 を吸着させ、核酸 1 と異なる挙動を示させることにより、夾雑物 2 と核酸 1 とを分離させるものであり、陽イオン界面活性剤 4 と非イオン界面活性剤 3 で核酸 1 以外の夾雑物 2 を帯電させ、電界中におくことで、夾雑物 2 を含む検体より核酸 1 を分離精製し、核酸 1 の濃縮もしくは濃縮しやすい状態とするものである。

## 【選択図】 図 1

特願 2003-379796

出願人履歴情報

識別番号

[000141897]

1. 変更年月日

2000年 6月12日

[変更理由]

名称変更

住所

京都府京都市南区東九条西明田町57番地

氏名

アークレイ株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**